

LeucoScreen Plus

Kit histochimique semi-quantitatif pour la détermination des leucocytes positifs à la peroxydase dans le sperme humain

IVD

Référence document: FP09 I111 R01 B.2

Mise à jour: 14/05/2024

MATÉRIEL INCLUS

Numéro de catalogue

LeucoScreen Plus

| | |
|------------|--|
| LEUCO_PLUS | LeucoScreen Plus – 40 days of analysis |
|------------|--|

SUPPORT CLIENTS-SUPPORT TECHNIQUE

FertiPro NV
Industriepark Noord 32
8730 Beernem / Belgium
Tel +32 (0)50 79 18 05
Fax +32 (0)50 79 17 99
URL: www.fertipro.com
E-mail: info@fertipro.com



LeucoScreen Plus

Usage diagnostic in vitro (DIV)

Réactif réservé à un usage professionnel

INFORMATIONS GÉNÉRALES

La plupart des éjaculats humains contiennent des leucocytes, dont la forme prédominante sont des granulocytes positifs à la peroxydase⁽¹⁻⁴⁾. Une présence excessive de ces cellules (leucocytospermie) peut indiquer une infection de l'appareil reproducteur. La leucocytospermie peut aussi être associée à d'autres anomalies du sperme (réduction de la motilité des spermatozoïdes et de l'intégrité de l'ADN, augmentation de la viscosité du sperme et réduction de la fonction des spermatozoïdes en raison du stress oxydatif et/ou sécrétion de cytokines cytotoxiques par ces globules blancs)^(5, 6). Bien que la leucocytospermie ne soit pas une indication absolue d'infertilité, cette affection est observée en moyenne chez 10 à 20% de tous les hommes infertiles⁽⁷⁾.

Selon l'Organisation mondiale de la santé, la présence de plus d'un million de globules blancs positifs à la peroxydase (WBC) par ml d'éjaculat est considérée comme anormale et est étiquetée comme "leucocytospermie"⁽⁴⁾. Cependant, ce seuil fait l'objet d'un débat, certains ayant trouvé cette valeur trop faible et d'autres trop élevées. En effet, des seuils de 0.2×10^6 – 2×10^6 ont été rapportés dans la littérature⁽⁷⁻⁹⁾.

Lorsque le seuil d'un million de globules blancs positifs à la peroxydase par ml d'éjaculat est dépassé, des tests microbiologiques doivent être effectués pour déterminer s'il y a une infection des glandes annexes. L'évaluation des marqueurs des glandes annexes peut fournir des informations supplémentaires utiles sur le bon fonctionnement de l'épididyme (EpiScreen Plus, FertiPro Nv), des vésicules séminales (Fructose Test, FertiPro NV) ou de la prostate. Fait important, l'absence de leucocytes n'exclut pas toujours la possibilité d'une infection des glandes annexes.

UTILISATION PRÉVUE

LeucoScreen Plus est un kit histochimique et de diagnostic semi-quantitatif et non automatisé pour la détermination des leucocytes positifs à la peroxydase dans le sperme humain.

Le nombre de tests pouvant être effectués avec le kit LeucoScreen Plus n'est pas spécifié, en revanche le kit a été conçu pour 40 jours d'analyse pendant la durée de service du kit (20 solutions de travail peuvent être

réalisées, ces dernières seront stables pendant 2 jours consécutifs).

MATÉRIEL FOURNI AVEC LE TEST

Réactif 1 – 6 ml de solution de substrat (contient: 4-CN, méthanol)

Réactif 2 – 300 µl de peroxyde d'hydrogène à 30%

Réactif 3 – 22 ml de solution tampon

Réactif 4 – 1.2 ml of contre-colorant

Un certificat d'analyse et les fiches de données de sécurité sont disponibles sur demande ou peuvent être téléchargés sur notre site internet (www.fertipro.com).

MATÉRIEL RÉQUIS MAIS NON FOURNI

Lames de microscope, lamelles couvre-objet, tubes d'Eppendorf, pipettes, microscope optique

Remarque: il est conseillé d'utiliser un microscope optique et pas un microscope à contraste de phase car ce dernier pourrait entraîner des difficultés d'interprétation.

PRINCIPE DU TEST

Lorsqu'une analyse cytologique du sperme est effectuée, il est très difficile de différencier les globules blancs d'autres types de cellules rondes (par exemple certaines de la lignée germinale⁽¹⁰⁾). LeucoScreen Plus utilise l'activité peroxydase intrinsèque de certains globules blancs et peut donc être employé pour différencier les globules blancs positifs à la peroxydase (p. ex. les granulocytes polymorphonucléaires (PMN) et macrophages) dans un échantillon de sperme humain d'autres types de cellules rondes.

En présence du Réactif 2 (H₂O₂), la myéloperoxydase dans les granules de leucocytes oxyde le Réactif 1 (4-CN) pour former un précipité bleu-violet (4-chloro-1-naphton). Le Réactif 4 est une solution de contre-coloration pour faciliter la différenciation entre les cellules rondes positives à la peroxydase et les cellules rondes négatives à la peroxydase.

MÉTHODE

Avant la première utilisation du kit LeucoScreen Plus, nous vous recommandons vivement de suivre le programme d'entraînement et de regarder notre vidéo de démonstration, qui sont tous deux disponibles sur notre site Internet. Ou scannez le code-barres pour voir le vidéo:



Type d'échantillon

Le test doit être exécuté sur des échantillons de sperme humain frais contenant plus de 1×10^6 de cellules rondes par ml.

Collecte de l'échantillon

Des récipients standard de collecte de sperme doivent être utilisés. Ils sont généralement fabriqués en polypropylène et soumis à des tests de survie/motilité des spermatozoïdes, lorsque l'échantillon de sperme est recueilli par masturbation. Des préservatifs en plastique non toxique pour les spermatozoïdes doivent être utilisés lorsqu'une collecte de sperme par masturbation n'est pas possible. Conserver le récipient de collecte de sperme à température ambiante avant d'y ajouter l'échantillon de sperme afin d'éviter toute variation importante de température susceptible d'affecter les spermatozoïdes. Le test doit être exécuté le jour du recueil du sperme.

Avertissements avant utilisation

Ne pas utiliser le produit si le sceau des flacons est ouvert ou défectueux lorsque le kit est livré.

Préparation du réactif

Le Réactif 1 doit contenir un liquide clair, ne pas utiliser le kit si le liquide est devenu jaune.

Méthode

- Comptez les cellules rondes en même temps que vous déterminez la concentration de spermatozoïdes lors d'une analyse de routine. Calculez et notez la concentration total de cellules rondes en millions/ml, car cette concentration est nécessaire pour le calcul de la concentration de globules blanc positives à la peroxydase. Quand la concentration de cellules rondes dépasse 1×10^6 par ml, le test LeucoScreen Plus est indiqué.
- Préparation de la solution de travail: ajoutez les volumes suivants dans un tube Eppendorf et mélangez soigneusement.
 - 200 µl de Réactif 1
 - 5 µl de Réactif 2
 - 1 ml de Réactif 3
 Cette solution de travail reste stable pendant 48 heures si stocké entre 2-8°C, à l'abri de la lumière (du soleil).
- Prenez 10 µl de l'échantillon de sperme et ajoutez 20 µl de la solution de travail. Mélangez à fond.
- Incubez deux minutes à température ambiante **dans l'obscurité**.

- Transférez 10 µl du mélange au milieu d'une lame de microscope et ajoutez 10 µl de Réactif 4. Mélangez à fond en utilisant le bord de la lamelle couvre-objet.
- Couvrez avec la lamelle couvre-objet.
- Comptez et classez un total de 200 cellules rondes en utilisant un grossissement x400. Explorez différents champs microscopiques (de préférence 20).
- Une fois chaque test terminé, jeter tous les réactifs et matériaux utilisés.

Remarque: Pour certains échantillons de sperme, vous pourriez préférer concentrer la préparation pour faciliter le comptage cellulaire. Dans ce cas, centrifuger l'échantillon pendant 15 minutes à 350g, enlever le volume de l'échantillon de sperme et remettre en suspension le culot.

En cas de concentration très élevée de cellules rondes (au-delà de 20×10^6 par ml), il est fortement conseillé de diluer l'échantillon dans du PBS ou dans du FertiCult™ Flushing medium.

INTERPRÉTATION

- Les cellules rondes positives à la peroxydase: contiennent des granules noirs (bleutés) et ont un cytoplasme gris anthracite. Cette zone anthracite peut couvrir la totalité de la cellule ou seulement une partie de celle-ci.
- Les cellules rondes négatives à la peroxydase: restent non colorés ou peuvent être coloré en rose. Les granules observés dans les cellules non colorées ne sont pas entourés de la couleur anthracite typique observée dans les cellules positives.

CALCUL DE LA CONCENTRATION DES LEUCOCYTES POSITIFS A LA PEROXYDASE

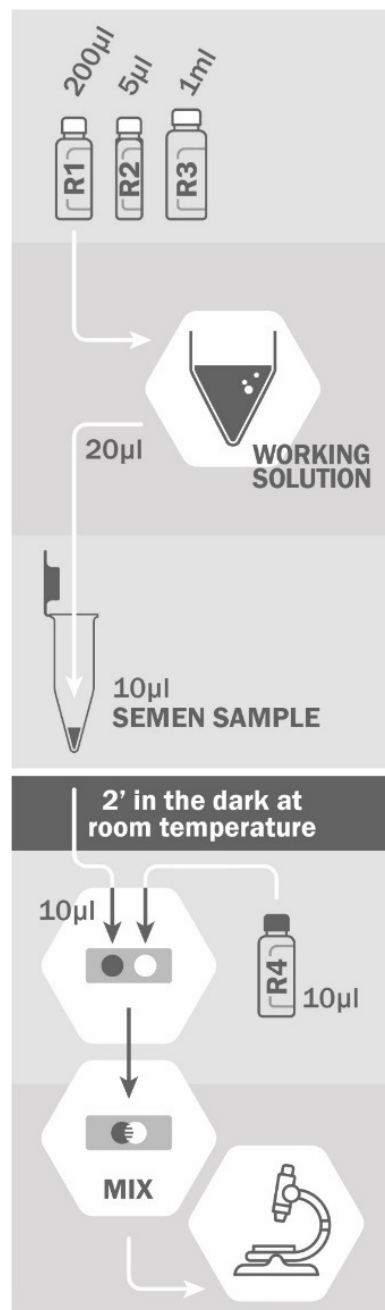
- Calculez la proportion de cellules positives à la peroxydase comme suit :

$$\text{PROPORTION DE CELLULES RONDES POSITIVES} = \frac{\text{Nombre de cellules rondes POSITIVES}}{(\text{Nombre de cellules rondes POSITIVES} + \text{Nombre de cellules rondes NÉGATIVES})}$$

- Calculez ensuite la concentration de leucocytes positifs à la peroxydase dans l'échantillon de sperme comme suit :

$$\text{CONCENTRATION (millions/ml)} = \text{Proportion de cellules rondes positives} \times \text{concentration totale de cellules rondes}$$

Présentation graphique du protocole:



Exemple:

- La concentration totale de cellules rondes est de 2 millions/ml (déterminée lors de l'analyse de la concentration des spermatozoïdes)
- Le test LeucoScreen Plus indique que 120 cellules rondes sont positives et 80 négatives
- Proportion de cellules rondes positives = $120 / (120 + 80) = 0.6$
- Concentration de leucocytes positifs à la peroxydase = $0.6 \times 2 \text{ millions/ml} = 1.2 \text{ million/ml}$

LIMITES DE LA MÉTHODE

Ce test est une aide au diagnostic de l'infertilité masculine et, comme pour les autres tests biologiques, les résultats doivent être interprétés à la lumière des observations cliniques et des données de l'anamnèse. Le test LeucoScreen Plus ne colore que les globules blancs positifs à la peroxydase; les autres types de globules blancs (lymphocytes et monocytes, p. ex.) ne peuvent pas être détectés de cette manière.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Répétabilité et reproductibilité: $CV_{\text{intra}} < 15\%$, $CV_{\text{inter}} < 15\%$
 Pourcentage de concordance positive : 88 % - Pourcentage de concordance négative : 96 %

CONSERVATION / L'ÉLIMINATION

- Le kit est stable pendant au moins de 12 mois après la date de production (même si les bouteilles ont été ouvertes).
- Ne pas utiliser après la date de péremption mentionnée sur l'étiquette du produit.
- Conservez les réactifs entre 2°C et 25°C
- Ne pas congeler.
- Protégez de la lumière (du soleil).
- Les bouteilles doivent rester hermétiquement fermées en tout temps.
- La solution de travail peut être conservée jusqu'à 48 heures à 2-8°C, protégée de la lumière (du soleil).
- Les réactifs doivent être éliminés conformément aux réglementations locales en matière d'élimination des dispositifs médicaux.

PRÉCAUTIONS

L'utilisation de gants est conseillée.

Réactif 1 contient du méthanol: liquide et vapeurs très inflammables, toxique par ingestion, par contact cutané

ou par inhalation, risque avéré d'effets graves pour les organes.

Réactif 2 contient de l' H_2O_2 : nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation, provoque des lésions oculaires graves. Portez une protection oculaire/des protections visage.

Réactif 3 contient du ProClin 950: provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves, peut provoquer une allergie cutanée.

Tous les échantillons de sperme doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Manipulez tous les échantillons comme s'ils étaient capables de transmettre le VIH ou l'hépatite. Utilisez toujours des pointes de pipette neuve pour chaque étape afin d'éviter la contamination croisée. Ne jetez pas le produit dans l'environnement.

Tout incident grave (tel que défini dans le Règlement européen 2017/746 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro) doit être signalé à FertiPro NV et, le cas échéant, à l'autorité compétente de l'État membre de l'UE dans lequel l'utilisateur et/ou le patient sont établis.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wolff H, Anderson DJ. Immunohistologic characterization and quantitation of leukocyte subpopulations in human semen. *Fertil Steril.* 1988;49(3):497-504.
2. Aitken RJ, West KM. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl.* 1990;13(6):433-51.
3. Barratt CL, Bolton AE, Cooke ID. Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract. *Hum Reprod.* 1990;5(6):639-48.
4. Geneva: World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2021; sixth edition.
5. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989;41(1):183-97.
6. Hill JA, Haimovici F, Politch JA, Anderson DJ. Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertil Steril.* 1987;47(3):460-5.
7. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril.* 1995;63(6):1143-57.
8. Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl.* 2001;22(4):575-83.
9. Punab M, Loivukene K, Kermes K, Mandar R. The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia.* 2003;35(5):271-8.
10. Johansson E, Campana A, Luthi R, de Agostini A. Evaluation of 'round cells' in semen analysis: a comparative study. *Hum Reprod Update.* 2000;6(4):404-12.

GLOSSAIRE DES SYMBOLES

Symboles tels que définis dans la norme ISO 15223-1



Référence catalogue



Numéro de lot



Consulter les instructions d'utilisation



Fabricant



Diagnostics in vitro



Limite de température



Date de péremption



Tenir à l'écart de la lumière du soleil

Symbole tel que défini dans la norme IVDR 2017/746



2797

Marquage CE délivré par l'organisme notifié 2797

Symbole tel que défini dans le règlement (CE) n° 1272/2008 [CLP]



GHS08
Risque grave pour la santé humaine



GHS02
Liquide inflammable



GHS06
Toxicité aiguë



GHS07
Danger pour la santé humaine



GHS05:
Corrosion/irritation de la peau